



TITLE:

Structural design of cell-penetrating protein  
needles toward development of intracellular  
delivery systems( Digest\_要約 )

AUTHOR(S):

Inaba, Hiroshi

---

CITATION:

Inaba, Hiroshi. Structural design of cell-penetrating protein needles toward development of intracellular delivery systems. 京都大学, 2015, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2015-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18693>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は  
2015/11/25に公開; 許諾条件により要旨は2015/02/25に公開

京都大学	博士（工 学）	氏名	稲葉 央
論文題目	Structural design of cell-penetrating protein needles toward development of intracellular delivery systems (細胞内分子輸送システム構築を指向した細胞膜貫通針蛋白質の構造設計)		
(論文内容の要旨)			
<p>本博士論文では、人工針蛋白質の構造設計に基づく細胞内分子輸送システムの構築を研究テーマとしている。ウイルスを初めとするチューブ/ファイバー状蛋白質の表面に合成小分子やペプチド、蛋白質を化学的、遺伝子的手法を用いて導入することで、触媒や細胞内分子輸送システム等、様々なバイオナノマテリアルの構築が行われてきた。一方、これらチューブ/ファイバー状蛋白質はモノマー蛋白質やペプチドが自己集合して形成されるため、機能分子の位置や数の精密な設計が困難であった。また、一般的に蛋白質は細胞内への取り込み効率が低く、細胞内での機能化は未だに困難である。本研究では、バクテリオファージが細胞膜貫通に用いる針蛋白質に着目し、そこからβヘリックス構造を単離した人工針蛋白質の(1)表面のアミノ酸残基への化学的、遺伝子的修飾による機能設計、(2)βヘリックス構造が有すると推定される細胞膜貫通反応の解析を行った。得られた知見を組み合わせることで、金属錯体や蛋白質を針蛋白質上に導入し、効率的に <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> で細胞内への分子輸送、機能発現が可能な分子輸送システムの創成を目指した。本論文は、序論、及び本論（5章）より構成されている。</p> <p>序論では、導入部分において、一般的なチューブ/ファイバー状蛋白質の構造特性及び化学的、遺伝子的手法を用いた機能付加の研究について俯瞰した。バクテリオファージが共通モチーフとして有するβヘリックス針蛋白質について記述し、細胞膜貫通能を有する可能性があることを示した。更に、バクテリオファージ T4 由来のβヘリックス構造からなる針蛋白質β-PN (β-helical protein needle) の構築及び金属錯体の化学修飾による人工酵素の開発について詳細を記述した。βヘリックス構造はバクテリオファージの細胞膜貫通反応に重要であると示唆されているものの、実際に細胞膜透過実験を行った例はない。βヘリックスからなる安定な針蛋白質であるβ-PN が細胞膜貫通材料として有用である可能性を提示し、本研究が目的とする、針蛋白質の新たな展開である細胞膜貫通材料としての可能性、及び本博士論文の概略について詳述した。</p> <p>第1章では、β-PN の結晶構造に基づく分子設計を行い、触媒活性を持つ Sc 錯体をβ-PN 上で合成することに成功した。β-PN 表面の Thr, Ser 残基を補助配位子とみなし、その近傍に Cys 残基を変異導入した。Cys 残基に bipyridine 配位子を化学修飾することで、bipyridine、Thr、Ser 残基由来の-ROH 基からなる多座配位子を構築した。Sc(III)イオン存在下でエポキシドの付加環化反応を行った結果、bipyridine と Thr の混合物に比べ 20 倍以上の反応収率を示した。この結果から、結晶構造に基づきβ-PN 表面の望みの位置に合成配位子を導入し、アミノ酸残基を補助配位子として用いることで、触媒活性を有する複雑な Sc 錯体をβ-PN 上で半合成できることを示した。</p> <p>第2章では、β-PN の細胞膜貫通能を調査した。分子の表面電荷は細胞への取り込み効率、メカニズムに大きな影響を与えると推定されている。そこで、蛍光色素を化学修飾したβ-PN のカルボン酸 (Asp、Glu、C 末端由来)、アミン (Lys、N 末端由来) にそれぞれアミン、カルボン酸を化学修飾することで電荷を転換したβ-PN を作製し、赤血</p>			

京都大学	博士（工 学）	氏名	稲葉 央
<p>球、HeLa 細胞への取り込みを評価した。その結果、<math>\beta</math>-PN は（1）エンドサイトーシスを経ない直接的な機構で赤血球に取り込まれること、（2）直接的な機構とマクロピノサイトーシスを主な取り込み機構として HeLa 細胞に取り込まれることを見出した。電荷を転換した<math>\beta</math>-PN は赤血球、HeLa 細胞のどちらにおいても直接貫通の割合が減少したことから、<math>\beta</math>-PN 表面に配列した電荷を有する残基は、細胞膜を直接貫通するために最適化されていることが明らかとなった。本章は<math>\beta</math>-ヘリックス構造の細胞内取り込みを実験的に示した初めての例であり、<math>\beta</math>-PN を細胞内分子輸送に用いるための基本的な知見を示している。</p> <p>第 3 章では、第 1 章と第 2 章を受け、<math>\beta</math>-PN に一酸化炭素（CO）放出性の Ru カルボニル錯体を修飾することで、細胞内への効率的な CO 輸送に基づくシグナル伝達の制御について述べている。<math>\beta</math>-PN の両末端に導入した His<sub>6</sub> モチーフに Ru(CO)<sub>2</sub> を修飾した複合体（<math>\beta</math>-PN_Ru）を作製した。<math>\beta</math>-PN_Ru は、CO 輸送に広く用いられている CO 放出性錯体 Ru(CO)<sub>3</sub>Cl(glycinate) に比べ 60 倍以上の高効率で細胞内に取り込まれ、また約 9 倍の CO 放出の徐放性が確認された。これらの特性を用いることで、<math>\beta</math>-PN_Ru は Ru(CO)<sub>3</sub>Cl(glycinate) が細胞への効果を及ぼさない低濃度において、転写因子 NF-<math>\kappa</math>B を介したシグナル伝達を誘導できることを明らかとした。</p> <p>第 4 章では、遺伝子組み替えによって外来蛋白質である superfolder GFP（sfGFP）を <math>\beta</math>-PN に導入することで、細胞内への蛋白質輸送システムの構築を試みた。<math>\beta</math>-PN の N 末端にリンカーを介して sfGFP を融合した。この融合蛋白質（1_GFP）は溶液中、培地中で安定な針構造を保持していることを明らかとした。1_GFP の HeLa 細胞内への取り込みが観測され、細胞内において 1_GFP とプロテアーゼの反応によって sfGFP が <math>\beta</math>-PN から切り離されることを見出した。この結果から、<math>\beta</math>-PN をキャリアとした外来蛋白質の細胞内輸送システムの基盤を築いた。</p> <p>第 5 章では、第 4 章で確立した細胞内蛋白質輸送システムの <i>in vivo</i> への応用について記述している。1_GFP をマウスの網膜及び脳にインジェクションした後に、解剖して各組織への取り込みを共焦点顕微鏡で観察した。その結果、1_GFP は既存の蛋白質キャリアに比べて効率的に各組織に取り込まれることが明らかとなった。このことは、外来蛋白質を <math>\beta</math>-PN に複合化することで、これまで困難であった <i>in vivo</i> における蛋白質輸送を効率的に達成可能であることを示している。特に 1_GFP は各組織の幹細胞領域に局在化することが明らかとなり、<math>\beta</math>-PN を用いた蛋白質輸送システムが、ニューロン新生をはじめとする細胞分化制御の有用なツールとして利用できる可能性を示した。</p>			